

cited in the European Search
 Report of EP98940988.3
 Your Ref.: 56446-20016.43

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-327684

(43)公開日 平成7年(1995)12月19日

(51)Int.Cl.*

C 12 N 15/09
9/12

// (C 12 N 15/09

識別記号

Z NA

序内整理番号

F I

技術表示箇所

9281-4B

C 12 N 15/ 00

Z NA A

(C 12 N 15/ 00

Z NA A

審査請求 未請求 請求項の数 3 FD (全 23 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平6-150591

(22)出願日

平成6年(1994)6月9日

(71)出願人 591038141

資酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 上森 隆司

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 石野 良純

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(72)発明者 加藤 郁之進

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造
株式会社中央研究所内

(74)代理人 介理士 中本 宏 (外2名)

(54)【発明の名称】 DNAポリメラーゼ遺伝子

(57)【要約】

【目的】 新規のDNAポリメラーゼ遺伝子を特定し、
該遺伝子を用いる新規DNAポリメラーゼの遺伝子工学
的製造法を提供する。

【構成】 配列表の配列番号1若しくは2で示されるア
ミノ酸配列、又はそれらの一部であって、かつ、DNA
ポリメラーゼ活性を有する部分をコードするDNAポリ
メラーゼ遺伝子。該遺伝子に厳密な条件下でハイブリダ
イズ可能なDNAポリメラーゼ遺伝子。前記いずれかの
遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培
養し、該培養物から相当する前記のDNAポリメラーゼ
遺伝子がコードするDNAポリメラーゼを採取するDN
Aポリメラーゼの製造方法。

【効果】 耐熱性DNAポリメラーゼが提供される。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1若しくは2で示されるアミノ酸配列、又はそれらの一部であって、かつ、DNAポリメラーゼ活性を有する部分をコードするDNAポリメラーゼ遺伝子。

【請求項2】 請求項1に記載のDNAポリメラーゼ遺伝子に厳密な条件下でハイブリダイズ可能なDNAポリメラーゼ遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2に記載のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物から請求項1又は2に記載のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードするDNAポリメラーゼを採取することを特徴とするDNAポリメラーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規のDNAポリメラーゼ遺伝子及びDNAポリメラーゼの遺伝子工学的製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 今まで遺伝子工学研究用試薬として一般に利用されているDNAポリメラーゼとしては、大腸菌由来DNAポリメラーゼ、その変形であるクレノウ断片、サーマス アクアティカス (*Thermus aquaticus*) 由来DNAポリメラーゼ、バチルスカルドテナックス (*Bacillus caldotenax*) 由来DNAポリメラーゼ等がある。これらの酵素はその有する性質に応じて、DNAの標識化、PCR、DNA塩基配列決定等に利用されている。一般にDNAポリメラーゼはその起源による特異性を有しており、その特性を生かした利用法がある。ピロディクティウム オクルタム (*Pyrodictium occultum*) は生育至適温度が約105℃である超高温性古細菌であり、この細菌由来のDNAポリメラーゼは高温で安定することが予想されるため、遺伝子工学研究用試薬として有用な用途が期待される。ところが、該細菌は生育温度が非常に高い上に嫌気性があるのでその大量培養は困難である。したがって、該細菌の培養物からDNAポリメラーゼを直接大量に採取することは非常に困難である。一方、該細菌由来のDNAポリメラーゼの遺伝子については、アブストラクト オブジ アメリカン ソサイエティ フォー マイクロバイオロジー (Abstract of The American Society for Microbiology)、第93巻、第197頁(1993)に該細菌からDNAポリメラーゼ遺伝子が単離された旨が記載されている。しかしながら、803アミノ酸をコードし得るオープンリーディングフレームが存在するという以外に塩基配列等の該遺伝子を特定するに足る記載はなく、また、該DNAポリメラーゼを特定するに足るアミノ酸配列や酵素化学的性質の十分な記載もない。また、該細菌の他のDNAポリメラーゼ遺伝子についても記載されていない。

2

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、新規のDNAポリメラーゼ遺伝子を特定し、該遺伝子を含有させたプラスミドを保有する形質転換体を用いた新規DNAポリメラーゼの遺伝子工学的製造法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は配列表の配列番号1若しくは2で示されるアミノ酸配列、又はそれらの一部であって、かつ、DNAポリメラーゼ活性を有する部分をコードするDNAポリメラーゼ遺伝子に関する。本発明の第2の発明は第1の発明のDNAポリメラーゼ遺伝子に厳密な条件下でハイブリダイズ可能なDNAポリメラーゼ遺伝子に関する。本発明の第3の発明はDNAポリメラーゼの製造方法に関する。第1又は第2の発明のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有するプラスミドを保有する形質転換体を培養し、該培養物から第1又は第2の発明のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードするDNAポリメラーゼを探取することを特徴とする。

【0005】 本発明者らは鋭意研究の結果、ピロディクティウム オクルタムから2種の新規DNAポリメラーゼ遺伝子を見出し、これらをクローニングすることに成功した。更に、これらの遺伝子を導入した形質転換体を作製し、DNAポリメラーゼを大量生産することに成功し、本発明を完成した。

【0006】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に使用する菌株としては、例えば、ピロディクティウム オクルタム DSM 2709^T 株 (ドイツche ザムルンク フォン ミクロオルガニズメンウント ツエルクルチュウレン (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) GmbH の保存菌株: DSM 2709^T) がある。

【0007】 本発明のDNAポリメラーゼ遺伝子は次に例示する工程により得ることができる。

(1) ピロディクティウム オクルタムからDNAを抽出する。

(2) α 型DNAポリメラーゼに共通なアミノ酸配列を基に遺伝子增幅用オリゴヌクレオチドプライマーを作製し、(1)で得たDNAを錠型としてPCRを行う。

(3) (1)で得たDNAを適当な制限酵素で切断し、これに対して(2)で得た増幅DNA断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行う。

(4) (3)で適当な陽性シグナルが得られた制限酵素で(1)のDNAを切断し、それぞれの切断部位に合うカセットをDNAリガーゼで結合させる。

(5) カセット内の共通プライマーとプローブに用いたDNA断片中に貼り付くプライマーを用いてPCRを行い、増幅されるDNA断片の制限酵素マッピングを行うことにより、DNAポリメラーゼ遺伝子を含む周辺領域

の制限酵素地図を作成する。

(6) (5) の結果を基にDNAポリメラーゼをコードする全領域を含む断片が得られる制限酵素で(1)のDNAを切断し、ベクターに結合させる。

(7) DNA断片を結合させたベクターを宿主菌に導入し、目的のDNA断片を含む形質転換体を選択する。

(8) (7)で得た形質転換体を培養し、培養菌体抽出物のDNAポリメラーゼ活性を確認する。

【0008】上記DNA供与体であるピロディクティウム オクルタム DSM2709由来DNAは、100℃で嫌気培養した該培養菌体より抽出する。抽出、精製、制限酵素による切断等は公知の方法を用いることができ、当該方法の詳細は1982年 コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ほか著、モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual) 第75~178頁に記載されている。

【0009】目的のDNA断片を選択する方法としては、例えば、公知のDNAポリメラーゼのアミノ酸配列を比較し、共通のアミノ酸配列を示す領域を基にPCR用のプライマーを作製する。これまでに知られている古細菌由来のDNAポリメラーゼはα型であることから、例えば、公知のα型DNAポリメラーゼのアミノ酸配列を比較して、共通の領域を基にしてミックスプライマーを作製することができる。α型DNAポリメラーゼをクローニングするためのプライマーとしては、特開平6-14780号公報に記載のGC型、AT型、若しくは中間型のプライマーを使用することができる。これらは目的のDNAのGC含量に応じて使い分けることができる。

【0010】ピロディクティウム オクルタムは、システムティック アンド アプライドマイクロバイオロジー (Systematic and Applied Microbiology)、第4巻、第535~551頁 (1983) 記載のようにGC含量が62%と高いことから、本発明者らは配列表の配列番号3及び4に示されるGC型のプライマーを用いてピロディクティウム オクルタムDNAを鑄型してPCRを行った。その結果、特異的なDNA断片が増幅されることを見出した。更に、この増幅DNA断片の塩基配列を決定したところ、その推定されるアミノ酸配列が公知のDNAポリメラーゼと相同性を有する2種類の配列が見出された。これら2種類の増幅DNA断片の塩基配列を配列表の配列番号5(配列Iと称する)及び配列番号6(配列IIと称する)に示す。のことから、ピロディクティウム オクルタムが少なくとも2種類のDNAポリメラーゼを有することが示唆された。

【0011】これらのDNAポリメラーゼをコードする遺伝子は、例えば該増幅DNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより選択することが

できる。ハイブリダイゼーションによる選択は公知の方法、例えば、前記モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル、第309頁 (1982) に記載されている方法を用いることができる。ザザンハイブリダイゼーション法により目的のDNAポリメラーゼ遺伝子がピロディクティウム オクルタムDNAのどの制限酵素断片上に存在するかを分析した後、適当な制限酵素部位を有するカセットをそれぞれの切断断片に結合させ、その反応液を一部とてカセット内の共通プライマーとプローブ内の領域に貼りつくプライマーとでPCRを行い、得られた増幅断片を制限酵素分析することによりDNAポリメラーゼ遺伝子を含む領域の制限酵素地図を求めることができる。この結果よりDNAポリメラーゼをコードする全領域を含む断片をクローニングすべくピロディクティウム オクルタムDNAを切断し、ベクターに組込む。プラスミドベクターとしては公知のものが使用でき、例えばpUC18、pUC19、pTV118N、pTV119Nなどが挙げられるがこれらに限定されるものではない。また組込ませる手段についても公知の方法が利用でき、DNAリガーゼを用いた酵素反応で組込ませればよい。

【0012】次いで組換えプラスミドを宿主大腸菌に導入させるが、宿主大腸菌としては、形質転換能を有するものであれば野生株、変異株のいずれも使用できるが、制限系変異株で修飾系野生株 (r^+ , m^+) であることが望ましい。導入の手段自体は公知の方法、例えば前記モレキュラー クローニング、ア ラボラトリー マニュアル、第250頁 (1982) を用いることができる。このようにして目的のDNA断片を宿主に導入させ、プラスミドベクターの特性、例えばpUC18の場合アンビシリン耐性を有するコロニーを選択することによりクローニングされたDNAの集団を調製することができる。

【0013】次に上記集団の中から目的の断片を有するクローニングを選択する。選択の方法はベクターの種類によってコロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーションを用いればよく、方法自体は公知のものである。

【0014】本発明者らは、以上の方法で配列Iを有する増幅DNA断片(プローブI)をプローブとして約4.2kbのDNA断片をクローニングした。その塩基配列の一部を配列表の配列番号7に示す。また、配列IIを有する増幅DNA断片(プローブII)をプローブとして約3.1kbのDNA断片をクローニングした。その塩基配列の一部を配列表の配列番号8に示す。更に本発明者らはプローブIIを用いてクローニングした約3.1kbの断片をpTV119Nに組込んだプラスミドを作成し、pPO500-IIと命名した。プラスミドpPO500-IIを有する大腸菌を培養し、菌体の粗抽出液を得た。該抽出液は90℃20分処理後も十分量のDNA

ポリメラーゼ活性を有し、発現ベクターのみを有する大腸菌粗抽出液ではこのような活性を有しないことより、pPO500-II上に耐熱性DNAポリメラーゼ産生情報が存在し、かつ、大腸菌内で該情報を有する遺伝子が発現していると結論した。pPO500-IIで形質転換された大腸菌JM109はEscherichia coli JM109/pPO500-IIと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13659として寄託されている。

【0015】また、本発明者らは、プローブIを用いてクローニングした約4.2kbの断片をpTV118Nに組込んだプラスミドを作製し、pPO100-Iと命名した。プラスミドpPO100-Iを有する大腸菌を培養し、菌体の粗抽出液を得た。該抽出液は70℃20分処理後も十分量のDNAポリメラーゼ活性を有し、pPO100-I上に耐熱性DNAポリメラーゼ産生情報が存在し、かつ、大腸菌内で該情報を有する遺伝子が発現していると結論した。pPO100-Iで形質転換された大腸菌JM109はEscherichia coli JM109/pPO100-Iと命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13660として寄託されている。

【0016】また、得られたDNAポリメラーゼ遺伝子をプローブとして、厳密な条件下でハイブリダイゼーションを行えば、塩基配列は少し異なるが、実質的に同一である他のDNAポリメラーゼ遺伝子を得ることができる。

【0017】なお、かかる厳密な条件下とは、例えば、以下のとおりである。すなわち、DNAを固定したナイロン膜を、6×SSC(1×SSCは塩化ナトリウム8.76g、クエン酸ナトリウム4.41gを1リットルの水に溶かしたもの)、1%ラウリル硫酸ナトリウム、100μg/mlのサケ精子DNA、5×デンハルツ(Denhardt's)（ウシ血清アルブミン、ポリビニルビロリドン、フィコールをそれぞれ0.1%の濃度で含む）を含む溶液中で65℃で20時間プローブとハイブリダイゼーションを行うことである。

【0018】これらの耐熱性DNAポリメラーゼの精製法としては、培養菌体より、例えば超音波処理、熱処理、フェニルセファロースカラムクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースカラムクロマトグラフィー、モノ(Mono)Q(ファルマシア社)、モノS(ファルマシア社)の各処理を行い、該DNAポリメラーゼをほぼ単一のバンドとなるまで精製することができる。pPO500-II上のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードする耐熱性DNAポリメラーゼは、SDS-PAGEで約9万ダルトンの分子量を示すポリペプチドであり、DNA合成活性及び5'→3', 3'→5'エキソスクレアーゼ活性を有していた。また、pPO100-I上のDNAポリメラーゼ遺伝子がコードする耐熱性DNAポ

リメラーゼは、SDS-PAGEで約9.5万ダルトンの分子量を示すポリペプチドであり、DNA合成活性及び5'→3', 3'→5'エキソスクレアーゼ活性を有していた。これらの耐熱性DNAポリメラーゼは遺伝子工学研究用試薬として有用である。

【0019】また、本発明によって古細菌から2種類のDNAポリメラーゼが見出されたことは、以下のような興味深い知見も提供する。すなわち、真核生物の系では複数個のDNAポリメラーゼがDNA複製に働いているということが提唱されており、リーディング鎖合成、ラギング鎖合成がそれぞれ別のDNAポリメラーゼによって行われている可能性が示唆されている。一方原核生物では大腸菌の系で解析が進んでおり、複製酵素であるDNAポリメラーゼIIIが知られている。この酵素は10種類もの異なるタンパク質の複合体で、複合体が2量体になるときの組合せによって非対称性が現れ、これがリーディング鎖とラギング鎖合成のメカニカルな違いを説明している。しかし、古細菌では、これまで真核細胞の持つDNAポリメラーゼαに構造が類似したDNAポリメラーゼを有することが知られているが、DNA複製のメカニズムは全くわかっていない。今回、本発明者らは、α型と構造的に同じファミリーに属する2種類のDNAポリメラーゼ遺伝子を見出した。真核細胞は古細菌に真正細菌が共生して進化したと考えられており、おそらく本発明者らが見出した2種類のα型DNAポリメラーゼ遺伝子それぞれは、真核生物のDNAポリメラーゼα、δ、ε、のうちの2種類のDNAポリメラーゼに相当するものと考えられる。超好熱性古細菌からDNA複製に関与すると思われる2種類のDNAポリメラーゼ遺伝子を単離したことは、生物の原始により近いDNA複製のメカニズムを解明する手がかりを提供するものである。古細菌のDNA複製メカニズムの解明は高等生物のDNA複製の研究に役立てることができる。

【0020】

【実施例】以下、実施例をもって本発明を更に詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0021】実施例1

(1) ピロディクティウム オクルタム染色体DNAの調製

40 ピロディクティウム オクルタム DSM2709^TをDSMの指定する条件により嫌気的に培養した。150mlの培養から得た菌体を750μlの25%ショ糖、0.05Mトリス-塩酸(pH8.0)に懸濁し、150μlの0.5M EDTA、75mlのリゾチーム溶液(10mg/ml)を加えて20℃で1時間放置した。更に6mlのSET溶液(20mMトリス-塩酸pH8.0、1mM EDTA、150mM NaCl)を加えた後、375μlの10%SDSと75μlのプロティナーゼK溶液(20mg/ml)を加えて、50 37℃で1時間放置した。フェノール抽出、クロロホル

ム抽出の後エタノール沈殿を行い、長鎖DNAを回収した。以上の操作により約7 μ gのDNAが得られた。

【0022】(2) PCRによる特異的DNAの増幅
配列表の配列番号3及び4に示す2種類のオリゴヌクレオチド(GC型プライマー1、2)を合成した。これらのプライマーをそれぞれ100pmolと実施例1-(1)で調製した染色体DNA1ngを用いて全量100 μ lの系で94℃で1分、45℃で2分、72℃で2分の条件でPCRを行った。反応液の5 μ lを取り、アガロースゲル電気泳動で分析した結果、約400bpのDNA断片が特異的に増幅していた。このDNA断片をSma Iで開裂したpUC118ベクターに組込んで塩基配列を決定した。その結果、2種類の配列が見出された。配列表の配列番号5(配列I)及び配列番号6(配列II)にその配列を示す。これらの配列はいずれも公知のDNAポリメラーゼの配列と相同性を有していた。

【0023】(3) ゲノミックサザン法によるDNAポリメラーゼ遺伝子の検索

実施例1-(1)で調製した染色体DNAを1つの制限酵素につき0.15 μ gを用いて、BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、XbaIの5種類の制限酵素で分解してアガロースゲル電気泳動に供した。次いでアガロースゲル上のDNAをナイロン膜に移し、プローブIIを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。プローブの標識はランダムプライミング法によって放射性標識した。ハイブリダイゼーションの条件は、5×SSC、0.1%SDS、5×デンハルツ液、100 μ g/mI仔牛胸腺DNA中65℃で5時間行った。2×SSC、0.1%SDS、中で5.5℃1時間洗浄した後、イメージングプレート(富士フィルム社)に感光して、イメージアナライザ-BAS-2000(富士フィルム社)で画像データを得た。その結果、BamHI、EcoRI、HindIII、PstI、XbaIでそれぞれ2.7kb、20kb、4.4kb、6.6kb、9.4kbの長さの位置に陽性シグナルを検出した。

【0024】(4) DNAポリメラーゼ遺伝子を含む領域の制限酵素地図の作成

実施例1-(1)で調製した染色体DNA0.3 μ gをBamHI、EcoRI、HindIII、又はPstIで切断した後、それぞれの切断部位を有するカセット(宝酒造社)各50ngをDNAリガーゼを用いて結合させた。この反応液からDNAをエタノール沈殿によって回収し、この一部を用いてPCRを行った。ネスティドPCRを行うために、あらかじめプローブIIの配列内で、GC型プライマー1、2(配列番号3、4)と同方向の特異的プライマーII-S1(配列番号11)、II-S2(配列番号12)を合成した。1回目のPCRはカセット中の配列に貼り付く配列表の配列番号9で示され

る共通のプライマー(カセットプライマーC1、宝酒造社)と配列番号3又は4で表されるプライマーを組合せて用いて行った。次にそのPCR溶液1mlを錠型とし、配列表の配列番号10で表されるカセットプライマー-C2(宝酒造社)とプライマーII-S1、又はII-S2の組合せでPCRを行った。増幅されたDNA断片をBamHI、HindIII、EcoRI、PstI、KpnI、XbaI、SmaI、SalIなどの制限酵素で切断して、制限酵素地図を作成した。図1にその制限酵素地図を示す。この制限酵素地図とPCRに用いたプライマーの位置から、PstI-KpnIの二重切断によって得られる約3.1kbの断片中にDNAポリメラーゼをコードする全領域が含まれていると推定した。

【0025】(5) DNAポリメラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

実施例1-(1)で調製した染色体DNA4 μ gをPstIとKpnIで切断し、3.1kb付近のDNAをアガロースゲルから回収した。回収はスプレック(SUPREC)-01(宝酒造社)による遠心法を用いた。pTV119N(宝酒造社)をPstIとKpnIで切断して開裂したものを調製し、回収断片と混合してDNAリガーゼで結合させた。次に大腸菌JM109株に導入して得られた形質転換体の集団からプローブIIをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションによって目的のクローナーを選択した。選択した形質転換体からプラスミドを回収し、目的のPstI-KpnI断片が導入されていることを確認し、該プラスミドをpPO500-IIと命名した。再度pPO500-IIを大腸菌JM109に導入して、Escherichia coli JM109/pPO500-II(FERM P-13659)を得た。更に、pPO500-IIにクローニングされているPstI-KpnI断片の塩基配列を決定した。その塩基配列を配列表の配列番号8に示す。その結果、803アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム(ORF)が認められた。そのアミノ酸配列を配列表の配列番号2に示す。

【0026】(6) 形質転換体の培養及び粗抽出液の調製

Escherichia coli JM109/pPO500-II(FERM P-13659)をアンピシリンが100 μ g/mlの濃度で存在するL培地5mlに植菌し37℃で培養した。培養液の濁度が0.6(A₆₀₀)のとき、誘導物質であるイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)を添加し更に15時間培養を行った。集菌後150 μ lの25%ショ糖、50mMトリス-塩酸(pH7.6)、10mMNaCl、1mM2-メルカプトエタノール、2 μ Mフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF)に懸濁し、リゾチームを0.5mg/mlの濃度で加えて0℃30分静置、その後37℃に移し、更に30分静置した。凍結融解を一度行った後、遠心分離(14000rpm、10分)により上

清を得た。得られた上清について100°C 15分の熱処理を行い、再度遠心分離(14000 rpm、10分)を行って上清を回収し粗抽出液とした。

【0027】(7) DNAポリメラーゼ活性の測定

反応溶液として20 mMトリス-塩酸(pH 6.3、7.5)、2.5 mM 塩化マグネシウム、1 mM 2-メルカプトエタノール、2 μM 活性化DNA、33 μM dATP、dCTP、dTTP、6.0 nM [³H]TTPを用意し、この溶液15.0 μlに対して適量の粗抽出液を加え、75°C、5分反応させた後、50 mM ピロリン酸、10% トリクロロ酢酸(TCA)を1 ml加えて反応を停止させた。氷中で5分間静置した後、全量をガラスフィルター上に移し、吸引ろ過した。10% TCAで数回洗浄した後、70% エタノールで置換し、フィルターを乾燥して液体シンチレーションカウンターでフィルター上の放射活性を測定した。1 mlの培養液から3.0 U単位のDNAポリメラーゼが得られた。

【0028】(8) プラスマドpPO500-IIを導入した大腸菌による耐熱性DNAポリメラーゼの生産

大腸菌JM109/pPO500-IIの培養液3リットルより得られた菌体4.2 gを緩衝液(150 mM トリス-塩酸pH 7.6、2 mM EDTA、2.4 mM PMSF)40 mlに懸濁し、超音波処理にて破碎した。最終濃度が0.2 Mになるように、硫酸アンモニウムを加え遠心分離(12,000 rpm、10分)した上清について90°C 10分の熱処理を行い粗抽出液を得た。このA₂₆₀を測定し1000(A₂₆₀)に対し、5%ポリエチレンイミン(PEI)溶液(pH 7.6)0.5 mlを加え4°Cで1時間かくはんした後、遠心分離(12,000 rpm、20分)して除核酸を行い、その上清を緩衝液(50 mM トリス-塩酸pH 7.6、2 mM EDTA、0.2 M 硫酸アンモニウム)で平衡化したフェニルセファロースカラム(6FFHi gh sub、ファルマシア社)1 mlに添加した。緩衝液50 mM トリス-塩酸pH 7.6、2 mM EDTA、緩衝液(50 mM トリス-塩酸pH 7.6、2 mM EDTA、20%エチレングリコール)で順に洗浄した後、0 M~4 M 尿素の直線濃度勾配で溶出して分画し、実施例1-(7)に従ってDNA活性ポリメラーゼ活性を調べた。次にその活性分画を集めて緩衝液(50 mM トリス-塩酸pH 7.6、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.2%トウイーン(Tween)20)で平衡化したハイトラップヘパリンカラム(ファルマシア社)1 mlに添加し150 mM KCl、及び150 mM~650 mM KClの直線濃度勾配で溶出し、活性分画を集めめた。活性分画は、緩衝液(50 mM トリス-塩酸pH 7.6、0.1 mM EDTA、0.2%トウイーン20)で透析し、同じ緩衝液で平衡化したモノQ(5 ml)に供し、未吸着分画を同じ緩衝

液で平衡化したモノS(5 ml)に添加して0 mM~500 mM NaCl直線濃度勾配で溶出し活性分画を集めめた。モノS分より2200 U酵素標品(PocDNAポリメラーゼII)を得、SDS-PAGE分析したところ、分子量約9万ダルトンの単一バンドを与えた。

【0029】(9) 5'→3' エキソスクレアーゼ活性の測定

pUC119をSspIで切断後アガロースゲルにて電気泳動し386 bpの断片をスプレックー01(宝酒造社)を用いて回収した。この断片の5'末端を[γ-³²P]ATPとメガラベルキット(宝酒造社)を用いて放射性標識し、NICKカラム(G50)(ファルマシア社)でゲルろ過して遊離の[γ-³²P]ATPを除去して基質とした。この基質1 ngと実施例1-(8)で得たPocDNAポリメラーゼII 0.05 Uを20 mM トリス-塩酸(pH 6.3、又はpH 7.7)2.5 mM MgCl₂溶液10 μl中で75°C 5分、10分、15分反応後エタノール25 μlと20 μg/μlグリコーゲン2 μlを加えてエタノール沈殿を行い、その上清及び沈殿の放射活性をチェレンコ法により液体シンチレーションカウンターで測定した。PocDNAポリメラーゼIIを加えた場合、時間と共に5'末端のスクレオチドの遊離に伴う上清の放射活性の上昇があり、5'→3' エキソスクレアーゼ活性が認められた。一方JM109大腸菌破碎液を加えた場合、放射活性の上昇はなく、5'→3' エキソスクレアーゼ活性は認められなかつた。

【0030】(10) 3'→5' エキソスクレアーゼ活性の測定

30 pUC119をSau3AIで切断後アガロースゲルにて電気泳動し341 bpの断片をスプレックー01(宝酒造社)を用いて回収した。この断片の3'末端を[α-³²P]dCTP、dATP、dTTP、dTTPとクレノウ酵素を用いて放射性標識し、NICKカラムでゲルろ過して遊離の[α-³²P]dCTPを除去して基質とした。この基質4 ngを20 mM トリス-塩酸(pH 6.3、又はpH 7.7)、2.5 mM MgCl₂、1.25 mg/mlのλ-HaeIII分解物の溶液10 μl中でPocDNAポリメラーゼII 0.2 U(pH 6.3)又は0.05 U(pH 7.7)と75°C 5分、10分、15分反応後実施例1-(9)と同様にエタノール沈殿を行い上清と沈殿の放射活性を測定した。反応は1.25 mg/mlのλ-HaeIII分解物を加えることによりKmに対して基質大過剰の条件で行った。その結果、PocDNAポリメラーゼを加えた場合、時間と共に3'末端のスクレオチドの遊離に伴う上清の放射活性の上昇があり、3'→5' エキソスクレアーゼ活性が認められた。一方JM109大腸菌破碎液を加えた場合は放射活性の上昇はなく、3'→5' エキソスクレアーゼ活性は認められなかつた。また、DNAポ

40 50

40 pUC119をSau3AIで切断後アガロースゲルにて電気泳動し341 bpの断片をスプレックー01(宝酒造社)を用いて回収した。この断片の3'末端を[α-³²P]dCTP、dATP、dTTP、dTTPとクレノウ酵素を用いて放射性標識し、NICKカラムでゲルろ過して遊離の[α-³²P]dCTPを除去して基質とした。この基質4 ngを20 mM トリス-塩酸(pH 6.3、又はpH 7.7)、2.5 mM MgCl₂、1.25 mg/mlのλ-HaeIII分解物の溶液10 μl中でPocDNAポリメラーゼII 0.2 U(pH 6.3)又は0.05 U(pH 7.7)と75°C 5分、10分、15分反応後実施例1-(9)と同様にエタノール沈殿を行い上清と沈殿の放射活性を測定した。反応は1.25 mg/mlのλ-HaeIII分解物を加えることによりKmに対して基質大過剰の条件で行った。その結果、PocDNAポリメラーゼを加えた場合、時間と共に3'末端のスクレオチドの遊離に伴う上清の放射活性の上昇があり、3'→5' エキソスクレアーゼ活性が認められた。一方JM109大腸菌破碎液を加えた場合は放射活性の上昇はなく、3'→5' エキソスクレアーゼ活性は認められなかつた。また、DNAポ

11

リメラーゼ活性に対する3'→5'エキソスクレアーゼ活性の割合を調べた結果、pH 6.3の場合よりもpH 7.7の場合の方が高く、約40倍であった。

【0031】実施例2

(1) DNAポリメラーゼ遺伝子を含むDNA断片のクローニング

プローブIを用いて実施例1-(3)と同様にしてサンハイブリダイゼーションを行った。その結果、約5.5 kbのEcoRI断片、約4.9 kbのHindIII断片、及び約1.7 kbのPstI断片が陽性を示した。プローブIの配列内でGC型プライマー1、2と同方向に特異的プライマーI-S1(配列番号13)、I-S2(配列番号14)を合成し、実施例1-(4)と同様にPCRを行って制限酵素地図を作成した。図2にその制限酵素地図を示す。制限酵素地図とPCRに用いたプライマーの位置から約4.2 kbのEcoRI-HindIII断片上にDNAポリメラーゼをコードする全領域が含まれていると推定した。次にpTV118N(宝酒造社)をEcoRIとHindIIIで開裂したものを調製し、実施例1-(5)と同様にして目的のクローニングを選択した。得られた組換体よりプラスミドを回収し、目的のEcoRI-HindIII断片が挿入されていることを確認し、該プラスミドをpPO100-Iと命名した。再度pPO100-Iを大腸菌JM109に導入して、Escherichia coli JM109/pPO100-I(FERM P-13660)を得た。更に、pPO100-IにクローニングされているEcoRI-HindIII断片のうち、SmaI-HindIII領域の塩基配列を決定した。その塩基配列を配列表の配列番号7に示す。その結果、塩基番号435~3176、540~3176にそれぞれ914、879アミノ酸からなるORFが認められた。914アミノ酸からなるORFのアミノ酸配列を、配列表の配列番号1に示す。879アミノ酸からなるORFは、配列番号1のうちアミノ酸番号36~914に相当する。

【0032】(2) 形質転換体の培養及び粗抽出液の調製

E. coli JM109/pPO100-Iをアンビシリングが100 μg/mlの濃度で存在するL培地5mlに植菌し37℃で20時間培養し、集菌後200 μlの2.5%ショ糖、5.0 mMトリス-塩酸(pH 7.6)、1.0 mM NaCl、1 mM 2-メルカプトエタノール、2 μM PMSFに懸濁し、リゾチームを0.5 mg/mlの濃度で加えて0℃30分静置、その後37℃に移し更に30分静置した。凍結融解を一度行った後遠心分離(14000 rpm、10分)により上清を得た。得られた上清について70℃20分の熱処理を行い再度遠心分離(14000 rpm、10分)を行って上清を回収し粗酵素液とした。実施例1-(7)と同様にしてDNAポリメラーゼ活性を測定したところ1mlの

12

培養液から0.22単位の活性が得られた。

【0033】(3) 発現系の改変

発現量を上げるためにベクターpET15b(ノバジェン社)のNcoI部位のATGよりDNAポリメラーゼが直接発現するプラスミドを構築した。最初に公知のαタイプのDNAポリメラーゼとのホモロジーより開始コドンと推定される2ヵ所のATGの領域(配列番号7の塩基番号435~437と510~512)にそれぞれNcoIサイトを導入するためのオリゴスクレオチド

10 1、2(配列番号15、16)を合成した。このオリゴスクレオチド1、又は2とpPO100-I、ミュータン(Mutan)-K(宝酒造社)を用いてサイトダイレクト

ミュータジネシスを行いpPO100-IにNcoIサイトを導入したプラスミドpPO100-IM1、pPO100-IM2を構築した。次にそれぞれのプラスミドによりNcoI-AfI II(1551 bpと1446 bp)断片とAfI II-EcoRV(1457 bp)断片を精製し(AfI IIサイトは配列番号7の塩基番号1983~1988にある)、pET-15bを

20 BamHIで切断後を平滑末端化し、更にNcoIで切断して得られるpET-15bNcoI-BamHI平滑化断片と混合しDNAリガーゼにより結合させた。それぞれの混合液を用いて大腸菌HB101を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミドを調製し、制限酵素解析よりNcoI-AfI II断片とAfI II-EcoRV断片が連結したプラスミドを選別しpPO2

20 00-IとpPO300-Iと命名した。すなわち、pPO200-Iは914アミノ酸(配列番号1)。ただし、2番目のアミノ酸はLysからGluに置換されている)、及び879アミノ酸(配列番号1のアミノ酸番号36~914)からなる2つのORFを含んでおり、pPO300-Iは879アミノ酸(配列番号1のアミノ酸番号36~914)からなる1つのORFを含んでいる。

【0034】(4) プラスミドpPO200-I、pPO300-Iを導入した大腸菌による耐熱性DNAポリメラーゼの生産

大腸菌HMS174(DE3)(ノバジェン社)にプラスミドpPO200-I又はpPO300-Iを導入した形質転換体をそれぞれHMS174(DE3)/pPO200-I、HMS174(DE3)/pPO300-Iと命名した。HMS174(DE3)/pPO200-IとHMS174(DE3)/pPO300-Iをそれぞれ2リットルのバッフル付フラスコで500 mlのL培地に植菌し濃度が0.7のとき1M IPTGを0.2 ml加え20時間培養した。培養液3リットルより得られた菌体4.4 gと4.3 gより実施例1-(8)と同様にしてDNAポリメラーゼを精製した。HMS174(DE3)/pPO200-Iからはヘパリ

50 ン活性画分より11250U得られSDS-PAGEで

13

ほぼ等量の分子量約9.5万ダルトンと10万ダルトンの2バンドを与えた。HMS 174 (DE 3) / pPO 300-I からはヘパリン活性画分より13350U得られ、SDS-PAGEで分子量約9.5万ダルトンの単一バンドを与えた。

【0035】HMS 174 (DE 3) / pPO 300-I より精製して得られた酵素標品 (PocDNAポリメラーゼ-I) を用いて実施例1-(9)、1-(10) と同様の方法で付随するスクレアーゼ活性の有無を調べた。5' → 3' エキソヌクレアーゼに関してはPocDNAポリメラーゼII同様活性が認められた。既知の α 型古細菌株由来の酵素であるピロコッカス フリオサス (*P. furiosus*) 由来のDNAポリメラーゼ (Pfu DNAポリメラーゼ、ストラタジーン社) にはこの活性は認められなかつた。3' → 5' エキソヌクレアーゼに関しては、PocDNAポリメラーゼII同様活性が認められ pH 6.3 より pH 7.7 の反応液においてより約7倍高い活性を示した。DNAポリメラーゼ活性に対する 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性の割合は pH 6.3 の反応液でPocDNAポリメラーゼIIの数10倍、Pfu DNAポリメラーゼの約3.5倍、pH 7.7 の反応液でPocDNAポリメラーゼIIの約14倍、Pfu DNAポリメラーゼの約1.5倍であった。

【0036】3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性はDN

配列：

Met	Lys	Ala	Gln	Pro	Gln	Leu	Ala	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Thr	Thr
1				5					10				15	
Glu	Lys	Ala	Val	Val	Asn	Val	Asp	Ala	Glu	Thr	Trp	Ala	Glu	Gln
					20				25				30	
His	Ala	Trp	Ser	Thr	Met	Val	Pro	Gln	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Ala
					35				40				45	
Gly	Tyr	Gly	Asp	Asp	Leu	Ala	Gly	Lys	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly
					50				55				60	
Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu	Glu	Arg	Leu	Ser	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr
					65				70				75	
Arg	Lys	Pro	Leu	Glu	Ala	Arg	Asp	Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Leu	Leu
					80				85				90	
Gln	Thr	Met	Tyr	Asp	Gly	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ile
					95				100				105	
Tyr	Asp	Asp	Arg	Asn	Gly	Ile	Val	Tyr	Val	Tyr	Phe	Asp	Arg	Thr
					110				115				120	
Gly	Tyr	Met	Pro	Tyr	Phe	Leu	Thr	Asp	Ile	Pro	Pro	Asp	Lys	Leu
					125				130				135	
Gln	Glu	Leu	His	Glu	Val	Val	Arg	His	Lys	Gly	Phe	Asp	His	Val
					140				145				150	
Glu	Val	Val	Glu	Lys	Phe	Asp	Leu	Leu	Arg	Trp	Gln	Arg	Arg	Lys
					155				160				165	
Val	Thr	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Thr	Pro	Asp	Val	Val	Arg	Val	Leu
					170				175				180	
Arg	Asp	Lys	Val	Pro	Arg	Ala	Trp	Glu	Ala	Asn	Ile	Lys	Phe	His

14

Aポリメラーゼの有するDNA合成時の校正機能と考えられ、錯型DNAに対して誤った塩基を取り込んで合成してしまったとき、これを切り離し、改めて正しい塩基を取り込む過程で大切な活性である。本発明におけるPocDNAポリメラーゼIのポリメラーゼ活性に対するエキソヌクレアーゼ活性の比率が、本発明のPocDNAポリメラーゼIIや既知のPfu DNAポリメラーゼの持つそれぞれの活性の比と比べて明らかに高いということはPocDNAポリメラーゼIが非常に高い正確性を持ったDNA合成を行うことを示唆している。

【0037】

【発明の効果】本発明により、遺伝子工学研究用試薬として有用な耐熱性DNAポリメラーゼをコードする遺伝子、及び該遺伝子を用いた耐熱性DNAポリメラーゼの遺伝子工学的製造方法が提供された。

【0038】

【配列表】

【0039】配列番号：1

配列の長さ：914

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

10

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

15

16

185	190	195
His Asn Tyr Ile Tyr Asp Tyr Gly Leu Val Pro Gly Met Lys Tyr		
200	205	210
Arg Val Gly Lys Gly Arg Leu Ile Leu Leu Gly Gly Glu Ala Ser		
215	220	225
Gly Asp Asp Glu Arg His Ile Arg Glu Ile Phe Ser Gly Glu Asp		
230	235	240
Glu Ser Thr Ile Glu Met Ala Val Lys Trp Leu Ser Leu Phe Glu		
245	250	255
Gln Pro Pro Pro Lys Pro Arg Arg Leu Ala Val Asp Ile Glu Val		
260	265	270
Phe Thr Pro Phe Lys Gly Arg Ile Pro Asp Pro Ser Thr Ala Ser		
275	280	285
Tyr Pro Val Ile Ser Val Ala Met Ser Ser Asp Glu Gly Trp Arg		
290	295	300
Ala Val Tyr Val Leu Ala Arg Pro Gly Val Pro Met Asn Pro Pro		
305	310	315
Arg Gly Pro Leu Pro Glu Asn Leu His Val Glu Ile Phe Asp Asp		
320	325	330
Glu Arg Ala Leu Ile Leu Glu Ala Phe Arg Leu Ile Ser Asn Tyr		
335	340	345
Pro Val Leu Leu Thr Phe Asn Gly Asp Asn Phe Asp Leu Pro Tyr		
350	355	360
Leu Tyr Asn Arg Ala Val Lys Leu Gly Ile Pro Arg Glu Tyr Ile		
365	370	375
Pro Phe Arg Ala Arg Ser Asp Tyr Val Thr Leu Glu Tyr Gly Phe		
380	385	390
His Ile Asp Leu Tyr Lys Phe Ser Thr Lys Ala Val Gln Ala		
395	400	405
Tyr Ala Phe Gly Asn Ala Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Asp Ala Ile		
410	415	420
Ala Ser Ala Leu Leu Gly Glu His Lys Val Glu Val Glu Ser Thr		
425	430	435
Val Ser Asp Leu Pro Phe Phe Glu Leu Val Arg Tyr Asn Val Arg		
440	445	450
Asp Ala Asp Leu Thr Leu Arg Leu Thr Thr Phe Asn Asn Asp Leu		
455	460	465
Val Trp Ser Leu Ile Ile Leu Leu Met Arg Ile Ser Lys Leu Pro		
470	475	480
Leu Glu Asp Val Thr Arg Ser Gln Val Ser Ala Trp Val Lys Ser		
485	490	495
Leu Phe Tyr Trp Glu His Arg Arg Gly Tyr Leu Ile Pro Ser		
500	505	510
Arg Glu Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gly Thr Thr Arg Ser Glu Ala		
515	520	525
Leu Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Gln Gly Ala Leu Val Leu Asp Pro		
530	535	540
Pro Ser Gly Ile Tyr Phe Asn Ile Val Val Leu Asp Phe Ala Ser		
545	550	555
Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Lys Arg Trp Asn Leu Ser Tyr Glu Thr		

(10)

17

560	565	570
Val Asn Pro Val Tyr Cys Pro Glu Ser Lys Leu Val Glu Val Pro		
575	580	585
Asp Val Gly His Lys Val Cys Met Ser Ile Pro Gly Leu Thr Ser		
590	595	600
Gln Ile Val Gly Leu Leu Arg Asp Tyr Arg Val Lys Ile Tyr Lys		
605	610	615
Lys Lys Ala Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Asp Val Arg Ala Trp		
620	625	630
Tyr Asn Thr Val Gln Ala Ala Met Lys Val Tyr Ile Asn Ala Ser		
635	640	645
Tyr Gly Val Phe Gly Ala Glu Ser Phe Pro Phe Tyr Ala Pro Pro		
650	655	660
Val Ala Glu Ser Val Thr Ala Ile Gly Arg Tyr Thr Ile Lys Gln		
665	670	675
Thr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly Leu Arg Val Leu Tyr Gly		
680	685	690
Asp Thr Asp Ser Leu Phe Ile Trp Asn Pro Asp Glu Asp Lys Leu		
695	700	705
Arg Glu Leu Gln Glu Tyr Val Glu Lys Asn Phe Gly Leu Asp Leu		
710	715	720
Glu Val Asp Lys Val Tyr Lys Phe Val Thr Phe Ser Gly Leu Lys		
725	730	735
Lys Asn Tyr Ile Gly Ala Tyr Glu Asp Gly Ser Ile Asp Val Lys		
740	745	750
Gly Met Val Ala Lys Lys Arg Asn Thr Pro Glu Phe Leu Lys Lys		
755	760	765
Glu Phe Ser Glu Met Leu Ala Val Ile Gly Ser Val Lys Ser Pro		
770	775	780
Glu Asp Phe Ile Lys Val Arg Arg Val Ile Arg Glu Arg Leu Arg		
785	790	795
Lys Val Tyr His Gly Leu Arg Asp Leu Glu Phe Asn Leu Asp Glu		
800	805	810
Leu Ala Ile Arg Met Ala Leu Asn Lys Pro Val Glu Ala Tyr Thr		
815	820	825
Lys Asn Thr Pro Gln His Val Lys Ala Ala Arg Gln Leu Ile Arg		
830	835	840
Ala Gly Val Gln Val Leu Pro Gly Asp Val Ile Ser Phe Val Lys		
845	850	855
Val Lys Gly Lys Glu Gly Val Lys Pro Val Gln Leu Ala Arg Leu		
860	865	870
Pro Glu Val Asp Val Glu Lys Tyr Val Glu Ser Met Arg Asn Val		
875	880	885
Phe Glu Gln Leu Leu Ala Ile Ser Met Ser Trp Asp Glu Ile		
890	895	900
Ile Gly Ser Ser Arg Leu Glu Ala Phe Phe Ser Arg Arg Gly		
905	910	

特開平7-327684

18

【0040】配列番号：2

配列の長さ：803

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：ペプチド

19

20

配列:

Met Thr Glu Thr Ile Glu Phe Val Leu Leu Asp Ser Ser Tyr Glu
 1 5 10 15
 Ile Leu Gly Lys Glu Pro Val Val Ile Leu Trp Gly Ile Thr Leu
 20 25 30
 Asp Gly Lys Arg Val Val Leu Leu Asp His Arg Phe Arg Pro Tyr
 35 40 45
 Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Arg Gly Tyr Glu Asp Met Val Glu Glu
 50 55 60
 Ile Ala Ala Ser Ile Arg Arg Leu Ser Val Val Lys Ser Pro Ile
 65 70 75
 Ile Asp Ala Lys Pro Leu Asp Lys Arg Tyr Phe Gly Arg Pro Arg
 80 85 90
 Lys Ala Val Lys Ile Thr Thr Met Ile Pro Glu Ser Val Arg His
 95 100 105
 Tyr Arg Glu Ala Val Lys Ile Glu Gly Val Glu Asp Ser Leu
 110 115 120
 Glu Ala Asp Ile Arg Phe Ala Met Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Arg
 125 130 135
 Leu Tyr Pro Phe Thr Val Tyr Arg Ile Pro Val Glu Asp Ala Gly
 140 145 150
 Arg Asn Pro Gly Phe Arg Val Asp Arg Val Tyr Lys Val Ala Gly
 155 160 165
 Asp Pro Glu Pro Leu Ala Asp Ile Thr Arg Ile Asp Leu Pro Pro
 170 175 180
 Met Arg Leu Val Ala Phe Asp Ile Glu Val Tyr Ser Arg Arg Gly
 185 190 195
 Ser Pro Asn Pro Ala Arg Asp Pro Val Ile Ile Val Ser Leu Arg
 200 205 210
 Asp Ser Glu Gly Lys Glu Arg Leu Ile Glu Ala Glu Gly His Asp
 215 220 225
 Asp Arg Arg Val Leu Arg Glu Phe Val Glu Tyr Val Arg Ala Phe
 230 235 240
 Asp Pro Asp Ile Ile Val Gly Tyr Asn Ser Asn His Phe Asp Trp
 245 250 255
 Pro Tyr Leu Met Glu Arg Ala Arg Arg Leu Gly Ile Lys Leu Asp
 260 265 270
 Val Thr Arg Arg Val Gly Ala Glu Pro Thr Thr Ser Val Tyr Gly
 275 280 285
 His Val Ser Val Gln Gly Arg Leu Asn Val Asp Leu Tyr Asp Tyr
 290 295 300
 Ala Glu Glu Met Pro Glu Ile Lys Met Lys Thr Leu Glu Glu Val
 305 310 315
 Ala Glu Tyr Leu Gly Val Met Lys Lys Ser Glu Arg Val Ile Ile
 320 325 330
 Glu Trp Trp Arg Ile Pro Glu Tyr Trp Asp Asp Glu Lys Lys Arg
 335 340 345
 Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Ala Leu Asp Asp Val Arg Ala Thr Tyr
 350 355 360
 Gly Leu Ala Glu Lys Met Leu Pro Phe Ala Ile Gln Leu Ser Thr

(12)

特開平7-327684

21

365	370	375
Val Thr Gly Val Pro Leu Asp Gln Val Gly Ala Met Gly Val Gly		
380	385	390
Phe Arg Leu Glu Trp Tyr Leu Met Arg Ala Ala Tyr Asp Met Asn		
395	400	405
Glu Leu Val Pro Asn Arg Val Glu Arg Arg Gly Glu Ser Tyr Lys		
410	415	420
Gly Ala Val Val Leu Lys Pro Leu Lys Gly Val His Glu Asn Val		
425	430	435
Val Val Leu Asp Phe Ser Ser Met Tyr Pro Ser Ile Met Ile Lys		
440	445	450
Tyr Asn Val Gly Pro Asp Thr Ile Val Asp Asp Pro Ser Glu Cys		
455	460	465
Pro Lys Tyr Gly Gly Cys Tyr Val Ala Pro Glu Val Gly His Arg		
470	475	480
Phe Arg Arg Ser Pro Pro Gly Phe Phe Lys Thr Val Leu Glu Asn		
485	490	495
Leu Leu Lys Leu Arg Arg Gln Val Lys Glu Lys Met Lys Glu Phe		
500	505	510
Pro Pro Asp Ser Pro Glu Tyr Arg Leu Tyr Asp Glu Arg Gln Lys		
515	520	525
Ala Leu Lys Val Leu Ala Asn Ala Ser Tyr Gly Tyr Met Gly Trp		
530	535	540
Ser His Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Arg Cys Ala Glu Ala Val Thr		
545	550	555
Ala Trp Gly Arg Asn Leu Ile Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Ala Arg		
560	565	570
Lys Leu Gly Leu Lys Val Ile Tyr Gly Asp Thr Asp Ser Leu Phe		
575	580	585
Val Val Tyr Asp Lys Glu Lys Val Glu Lys Leu Ile Glu Phe Val		
590	595	600
Glu Lys Glu Leu Gly Phe Glu Ile Lys Ile Asp Lys Ile Tyr Lys		
605	610	615
Lys Val Phe Phe Thr Glu Ala Lys Lys Arg Tyr Val Gly Leu Leu		
620	625	630
Glu Asp Gly Arg Ile Asp Ile Val Gly Phe Glu Ala Val Arg Gly		
635	640	645
Asp Trp Cys Glu Leu Ala Lys Glu Val Gln Glu Lys Ala Ala Glu		
650	655	660
Ile Val Leu Asn Thr Gly Asn Val Asp Lys Ala Ile Ser Tyr Ile		
665	670	675
Arg Glu Val Ile Lys Gln Leu Arg Glu Gly Lys Val Pro Ile Thr		
680	685	690
Lys Leu Ile Ile Trp Lys Thr Leu Ser Lys Arg Ile Glu Glu Tyr		
695	700	705
Glu His Asp Ala Pro His Val Met Ala Ala Arg Arg Met Lys Glu		
710	715	720
Ala Gly Tyr Glu Val Ser Pro Gly Asp Lys Val Gly Tyr Val Ile		
725	730	735
Val Lys Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Arg Ala Tyr Pro Tyr Phe		

22

(13)

特開平7-327684

23

24

740	745	750
Met Val Asp Pro Ser Thr Ile Asp Val Asn Tyr Tyr Ile Asp His		
755	760	765
Gln Ile Val Pro Ala Ala Leu Arg Ile Leu Ser Tyr Phe Gly Val		
770	775	780
Thr Glu Lys Gln Leu Lys Ala Ala Ala Thr Val Gln Arg Ser Leu		
785	790	795
Phe Asp Phe Phe Ala Ser Lys Lys		
800		

【0041】配列番号:3

配列の長さ:20

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

WSSYTSTACC CSWSSATCAT 20

【0042】配列番号:4

配列の長さ:20

配列の型:核酸

10 鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸(合成DNA)

配列:

TCNGTRTCNC CRTARATNAC 20

【0043】配列番号:5

配列の長さ:416

配列の型:核酸

鎖の数:二本鎖

トポロジー:直鎖状

20

配列:

AGC CTG TAC CCC AGT ATC ATA AAG AGG TGG AAC CTA AGC TAC GAG 45

Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Lys Arg Trp Asn Leu Ser Tyr Glu

1 5 10 15

ACC GTA AAC CCC GTA TAC TGC CCC GAA TCG AAG CTA GTG GAG GTT 90

Thr Val Asn Pro Val Tyr Cys Pro Glu Ser Lys Leu Val Glu Val

20 25 30

CCC GAT GTA GGG CAT AAG GTG TGC ATG AGC ATA CCC GGC CTG ACC 135

Pro Asp Val Gly His Lys Val Cys Met Ser Ile Pro Gly Leu Thr

35 40 45

TCG CAG ATA GTT GCC CTG CTT AGG GAC TAT CGA GTC AAG ATA TAC 180

Ser Gln Ile Val Gly Leu Leu Arg Asp Tyr Arg Val Lys Ile Tyr

50 55 60

AAG AAG AAG GCC AAG GAT AAG AGT CTG CCG GAT GAT GTT AGA GCA 225

Lys Lys Lys Ala Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Asp Val Arg Ala

65 70 75

TGG TAT AAT ACA GTC CAG GCA GCC ATG AAG GTG TAT ATA AAT GCC 270

Trp Tyr Asn Thr Val Gln Ala Ala Met Lys Val Tyr Ile Asn Ala

80 85 90

AGC TAT GGA GTC TTC GGG GCC GAG AGC TTC CCG TTC TAC GGC CCG 315

Ser Tyr Gly Val Phe Gly Ala Glu Ser Phe Pro Phe Tyr Ala Pro

95 100 105

CCG GTC GCG GAG AGC GTC ACA GCA ATA GGC AGG TAT ACT ATC AAG 360

Pro Val Ala Glu Ser Val Thr Ala Ile Gly Arg Tyr Thr Ile Lys

110 115 120

CAG ACG CTG CAG AAG GCT GGC GAA CTA GGG CTC CGC GTG ATC TAT 405

Gln Thr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly Leu Arg Val Leu Tyr

125 130 135

GCC GAT ACG GA 416

Gly Asp Thr

(15)

特開平7-327684

27

28

CTA ACG ACA GAG AAG GCC GTG GTG AAC GTG GAT GCA GAA ACC TGG Leu Thr Thr Glu Lys Ala Val Val Asn Val Asp Ala Glu Thr Trp 15 20 25	515
GCT GAG CAG CAT GCA TGG AGC ACT ATG GTG CCT CAG AGC TCT ACG Ala Glu Gln His Ala Trp Ser Thr Met Val Pro Gln Ser Ser Thr 30 35 40	560
CCC CCC GCG GGG TAT GGA GAT GAT CTG GCA GGG AAG CTG GGT TCG Pro Pro Ala Gly Tyr Gly Asp Asp Leu Ala Gly Lys Leu Gly Ser 45 50 55	605
CTG CTA GGG GGC TCA CGG GGT GCC CTT GAG AGA CTT TCC GCT CTC Leu Leu Gly Gly Ser Arg Gly Ala Leu Glu Arg Leu Ser Ala Leu 60 65 70	650
CCG CTT ACG CGC AAA CCC CTG GAA GCG CGT GAT GGG GTT GAG GGT Pro Leu Thr Arg Lys Pro Leu Glu Ala Arg Asp Gly Val Glu Gly 75 80 85	695
TTC CTG CTT CAA ACA ATG TAT GAC GGG GAG AGG GGT GTT GCG GCG Phe Leu Leu Gln Thr Met Tyr Asp Gly Glu Arg Gly Val Ala Ala 90 95 100	740
GCT AAG ATA TAT GAC GAC CGT AAT GGC ATT GTC TAC GTC TAC TTT Ala Lys Ile Tyr Asp Asp Arg Asn Gly Ile Val Tyr Val Tyr Phe 105 110 115	785
GAT AGG ACT GGT TAC ATG CCA TAC TTT CTA ACC GAT ATA CCA CCG Asp Arg Thr Gly Tyr Met Pro Tyr Phe Leu Thr Asp Ile Pro Pro 120 125 130	830
GAC AAG CTG CAG GAG CTT CAC GAG GTG GTG CGG CAT AAG GGG TTC Asp Lys Leu Gln Glu Leu His Glu Val Val Arg His Lys Gly Phe 135 140 145	875
GAC CAT GTT GAG GTT GTG GAG AAG TTT GAT CTC CTG CGT TGG CAG Asp His Val Glu Val Glu Lys Phe Asp Leu Arg Trp Gln 150 155 160	920
CGT AGG AAG GTT ACT AAG ATC GTT GTA AAG ACC CCC GAT GTG GTG Arg Arg Lys Val Thr Lys Ile Val Val Lys Thr Pro Asp Val Val 165 170 175	965
AGG GTG CTC CGT GAC AAG GTT CCA CGC GCC TGG GAG GCC AAT ATA Arg Val Leu Arg Asp Lys Val Pro Arg Ala Trp Glu Ala Asn Ile 180 185 190	1010
AAG TTT CAC CAC AAC TAT ATA TAT GAT TAT GGG CTA GTG CCT GGA Lys Phe His His Asn Tyr Ile Tyr Asp Tyr Gly Leu Val Pro Gly 195 200 205	1055
ATC AAG TAC CGC GTC GGG AAG GCC AGC CTA ATC CTC CTG GGG GCA Met Lys Tyr Arg Val Gly Lys Gly Arg Leu Ile Leu Gly Gly 210 215 220	1100
GAG GCT AGC GGG GAC GAT GAG CGC CAT ATA CGC GAG ATA TTC AGT Glu Ala Ser Gly Asp Asp Glu Arg His Ile Arg Glu Ile Phe Ser 225 230 235	1145
GGT GAG GAT GAA AGC ACT ATT GAG ATG GCA GTA AAA TGG CTC TCC Gly Glu Asp Glu Ser Thr Ile Glu Met Ala Val Lys Trp Leu Ser 240 245 250	1190
CTG TTT GAG CAG CCT CCC CCT AAG CCT CGT AGA CTT GCA GTG GAC Leu Phe Glu Gln Pro Pro Lys Pro Arg Arg Leu Ala Val Asp	1235

(16)

特開平7-327684

29

30

255	260	265	
ATC GAG GTA TTC ACT CCC TTC AAG GGC CGT ATA CCA GAC CCT TCC			1280
Ile Glu Val Phe Thr Pro Phe Lys Gly Arg Ile Pro Asp Pro Ser			
270	275	280	
ACA GCC AGC TAC CCT GTA ATC AGT GTA GCT ATG TCC TCG GAC GAG			1325
Thr Ala Ser Tyr Pro Val Ile Ser Val Ala Met Ser Ser Asp Glu			
285	290	295	
GCG TGG CGC GCG GTC TAT GTG CTG GCG CCG CCC GTG CCT ATG			1370
Gly Trp Arg Ala Val Tyr Val Leu Ala Arg Pro Gly Val Pro Met			
300	305	310	
AAT CCC CCG CGT GCC CCA TTA CCC GAG AAT CTA CAC GTA GAG ATA			1415
Asn Pro Pro Arg Gly Pro Leu Pro Glu Asn Leu His Val Glu Ile			
315	320	325	
TTC GAC GAT GAG CGT GCA CTC ATA TTG GAG GCG TTC CGG CTT ATA			1460
Phe Asp Asp Glu Arg Ala Leu Ile Leu Glu Ala Phe Arg Leu Ile			
330	335	340	
TCA AAC TAC CCG GTG CTG CTC ACC TTC AAC GGT GAT AAC TTT GAC			1505
Ser Asn Tyr Pro Val Leu Leu Thr Phe Asn Gly Asp Asn Phe Asp			
345	350	355	
CTC CCC TAC CTC TAC AAC CGG GCA GTA AAA CTA GGC ATA CCA CGC			1550
Leu Pro Tyr Leu Tyr Asn Arg Ala Val Lys Leu Gly Ile Pro Arg			
360	365	370	
GAG TAC ATA CCA TTC CGT GCT AGA AGC GAC TAT GTG ACA TTG GAG			1595
Glu Tyr Ile Pro Phe Arg Ala Arg Ser Asp Tyr Val Thr Leu Glu			
375	380	385	
TAC GGC TTC CAT ATA GAC CTC TAT AAG TTC TTC AGC ACC AAG GCG			1640
Tyr Gly Phe His Ile Asp Leu Tyr Lys Phe Phe Ser Thr Lys Ala			
390	395	400	
GTT CAG GCA TAT GCC TTC GGC AAC GCT TAC CAG GAG TTC ACC CTT			1685
Val Glu Ala Tyr Ala Phe Gly Asn Ala Tyr Glu Phe Thr Leu			
405	410	415	
GAT GCT ATA GCC TCT GCG TTG CTG GGG GAG CAC AAG GTG GAG GTC			1730
Asp Ala Ile Ala Ser Ala Leu Leu Gly Glu His Lys Val Glu Val			
420	425	430	
GAG TCT ACT GTA AGC GAC CTA CCA TTC TTT GAG CTG GTC AGG TAT			1775
Glu Ser Thr Val Ser Asp Leu Pro Phe Phe Glu Leu Val Arg Tyr			
435	440	445	
AAT GTG CGT GAC GCT GAT CTA ACC CTT AGG CTA ACA ACG TTC AAC			1820
Asn Val Arg Asp Ala Asp Leu Thr Leu Arg Leu Thr Phe Asn			
450	455	460	
AAC GAC CTG GTA TGG TCC CTT ATC ATA CTG CTA ATG CGT ATC TCC			1865
Asn Asp Leu Val Trp Ser Leu Ile Ile Leu Leu Met Arg Ile Ser			
465	470	475	
AAG CTG CCT CTG GAG GAT GTC ACG AGA ACC CAG GTC TCA GCT TGG			1910
Lys Leu Pro Leu Glu Asp Val Thr Arg Ser Glu Val Ser Ala Trp			
480	485	490	
GTG AAC AGC TTA TTC TAC TGG GAG CAT AGG AGG AGG GGC TAC CTA			1955
Val Lys Ser Leu Phe Tyr Trp Glu His Arg Arg Arg Gly Tyr Leu			
495	500	505	
ATA CCA TCA AGG GAG GAG ATA ATA CGG CTT AAG GGC ACC ACC CGC			2000

(17)

特開平7-327684

31

Ile Pro Ser Arg Glu Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gly Thr Thr Arg
 510 515 520
 TCT GAA GCC CTG ATA AAG GGT AAG AAG TAT CAG GGG GCG CTA GTC
 Ser Glu Ala Leu Ile Lys Gly Lys Lys Tyr Gin Gly Ala Leu Val
 525 530 535
 CTT GAC CCG CCT AGC GCC ATA TAC TTC AAC ATA GTG GTG CTT GAC
 Leu Asp Pro Pro Ser Gly Ile Tyr Phe Asn Ile Val Val Leu Asp
 540 545 550
 TTC GCC AGC CTG TAC CCC ACT ATA ATA AAG AGG TGG AAC CTA AGC
 Phe Ala Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Lys Arg Trp Asn Leu Ser
 555 560 565
 TAC GAG ACC GTA AAC CCC GTA TAC TCC CCC GAA TCG AAG CTA GTG
 Tyr Glu Thr Val Asn Pro Val Tyr Cys Pro Glu Ser Lys Leu Val
 570 575 580
 GAG GTT CCC GAT GTA GGG CAT AAG GTG TGC ATG AGC ATA CCC GGC
 Glu Val Pro Asp Val Gly His Lys Val Cys Met Ser Ile Pro Gly
 585 590 595
 CTG ACC TCG CAG ATA GTT GGC CTG CTT AGG GAC TAT CGA GTC AAG
 Leu Thr Ser Gln Ile Val Gly Leu Leu Arg Asp Tyr Arg Val Lys
 600 605 610
 ATA TAC AAG AAG AAG GCC AAG GAT AAG AGT CTG CCG GAT GAT GTT
 Ile Tyr Lys Lys Ala Lys Asp Lys Ser Leu Pro Asp Asp Val
 615 620 625
 AGA GCA TGG TAT AAT ACA GTC CAG GCA GCC ATG AAG GTG TAT ATA
 Arg Ala Trp Tyr Asn Thr Val Gln Ala Ala Met Lys Val Tyr Ile
 630 635 640
 AAT GCC AGC TAT GGA GTC TTC GGG GCC GAG AGC TTC CCG TTC TAC
 Asn Ala Ser Tyr Val Phe Gly Ala Glu Ser Phe Pro Phe Tyr
 645 650 655
 GCG CCG CCG GTA GCG GAG AGC GTC ACA GCC ATA GGC AGG TAT ACT
 Ala Pro Pro Val Ala Glu Ser Val Thr Ala Ile Gly Arg Tyr Thr
 660 665 670
 ATC AAG CAG ACG CTG CAG AAG GCT GGC GAA CTA GGG CTC CGC GTG
 Ile Lys Gln Thr Leu Gln Lys Ala Gly Glu Leu Gly Leu Arg Val
 675 680 685
 CTC TAT GGC GAT ACG GAC TCA CTA TTC ATA TGG AAT CCA GAT GAG
 Leu Tyr Gly Asp Thr Asp Ser Leu Phe Ile Trp Asn Pro Asp Glu
 690 695 700
 GAT AAG CTG CGG GAG CTG CAA GAG TAT GTA GAG AAG AAC TTT GGC
 Asp Lys Leu Arg Glu Leu Gln Glu Tyr Val Glu Lys Asn Phe Gly
 705 710 715
 CTA GAC CTT GAG GTT GAT AAG GTC TAT AAA TTC GTG ACA TTT AGC
 Leu Asp Leu Glu Val Asp Lys Val Tyr Lys Phe Val Thr Phe Ser
 720 725 730
 GGC CTG AAG AAC TAT ATA GGC GCC TAC GAG GAT GGA AGC ATC
 Gly Leu Lys Lys Asn Tyr Ile Gly Ala Tyr Glu Asp Gly Ser Ile
 735 740 745
 GAT GTC AAG GGT ATG GTC GCT AAG AAG CGT AAT ACG CCG GAG TTC
 Asp Val Lys Gly Met Val Ala Lys Lys Arg Asn Thr Pro Glu Phe
 750 755 760

32

(18)

特開平7-327684

33

34

CTC AAG AAG GAG TTT AGC GAG ATG CTA GCA GTT ATA GGC TCT GTT Leu Lys Lys Glu Phe Ser Glu Met Leu Ala Val Ile Gly Ser Val 765 770 775	2765
AAG AGC CCT GAG GAC TTC ATA AAG GTG AGG AGA GTT ATA CGT GAA Lys Ser Pro Glu Asp Phe Ile Lys Val Arg Arg Val Ile Arg Glu 780 785 790	2810
AGG CTG CCC AAA GTA TAC CAT GGC CTG CGC GAC CTG GAG TTC AAC Arg Leu Arg Lys Val Tyr His Gly Leu Arg Asp Leu Glu Phe Asn 795 800 805	2855
TTA GAC GAG CTA GCC ATA AGG ATG GCT TTA AAC AAG CCC GTT GAG Leu Asp Glu Leu Ala Ile Arg Met Ala Leu Asn Lys Pro Val Glu 810 815 820	2900
GCC TAT ACC AAG AAT ACG CCC CAG CAT GTG AAG GCT GCG CGG CAG Ala Tyr Thr Lys Asn Thr Pro Gln His Val Lys Ala Ala Arg Gln 825 830 835	2945
CTC ATA AGG CGG GGG GTG CAG GTG CTG CCA GGT GAT GTC ATA TCC Leu Ile Arg Ala Gly Val Gln Val Leu Pro Gly Asp Val Ile Ser 840 845 850	2990
TTC GTT AAA GTG AAG GCC AAG GAG GGT GTT AAG CCG GTC CAA CTC Phe Val Lys Val Lys Gly Lys Glu Gly Val Lys Pro Val Gln Leu 855 860 865	3035
GCA AGA CTG CCG GAG GTT GAT GTA GAG AAG TAT GTG GAG AGC ATG Ala Arg Leu Pro Glu Val Asp Val Glu Lys Tyr Val Glu Ser Met 870 875 880	3080
AGG AAT GTG TTT GAA CAG CTA CTG CTT GCA ATA AGT ATG TCG TGG Arg Asn Val Phe Glu Gln Leu Leu Ala Ile Ser Met Ser Trp 885 890 895	3125
GAT GAG ATA ATA GGC TCC TCG AGG CTT GAG GCC TTC TTT AGC CGC Asp Glu Ile Ile Gly Ser Ser Arg Leu Glu Ala Phe Phe Ser Arg 900 905 910	3170
CGG GGC TAGCTTGAG AAAGCTATCT TTTCCGGCTT CTACCCCTCT TCTTAGGCCT Arg Gly	3226
CTCCTCTAGC TCTTCCAAGC CTTCCCTCGAG TCGCTTGATC TCCTCTTCGC CAAGCGATAG 3286 CTGTGCCCTCC CGGCCCATCT TCTTGGGCTC TTTTGTGCG TCTATGGGT ACTCCCTAG 3346 CTGTGCTTTT GCGGCTCGT CAAGGTAGTA GGATATCACA TACATGGTC TGTCAAGGTA 3406 TGGCTCTCG AGCCATGCAT TATCGAAGCT 3437	

【0046】配列番号：8

配列の長さ：3068

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：ピロディクティウム オクルタム (*Pyrodictium occultum*)40 株名：DSM2709^T

配列の特徴：

配列：

CTGCAGCTCT CGGGGCTACA GCTCCTTCGT GCTCGAGGTG GAGGGCGGCA ACTATCCAGC 60
GCAGAGCTA TATGCGAGAA GCTCCTCAA GCCCCGTATG ATAGTGCCTG ACTACTATGG 120
CGAGGGCCGG CACGCTGTGG TCATGGCGTT GTTGGGGAG AGGCCCTGCT GCCTAGACGG 180
CTAGCCGTCC TCATGGCTTA GCGGGCAGAG GCAGGCAATG ATATACGATT ATCTAGGGC 240
GGGTGGTGGT AGATTCTCCA GGGCAGAGCC AGCCC ATG ACA GAG ACT ATA GAG TTC 296
Met Thr Glu Thr Ile Glu Phe

35		36
GTC CTG CTA GAC TCT AGC TAC GAG ATA CTG GGG AAG GAG CCG GTA Val Leu Leu Asp Ser Ser Tyr Glu Ile Leu Gly Lys Glu Pro Val 10 15 20		341
GTA ATC CTC TGG GGG ATA ACG CTT GAC GGT AAA CGT GTC GTG CTT Val Ile Leu Trp Gly Ile Thr Leu Asp Gly Lys Arg Val Val Leu 25 30 35		386
CTA GAC CAC CGC TTC CGC CCC TAC TTC TAC GCC CTC ATA GCC CGG Leu Asp His Arg Phe Arg Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Ile Ala Arg 40 45 50		431
GGC TAT GAG GAT ATG GTG GAG GAG ATA GCA GCT TCC ATA AGG AGG Gly Tyr Glu Asp Met Val Glu Ile Ala Ala Ser Ile Arg Arg 55 60 65		476
CTT AGT GTG GTC AAG AGT CCG ATA ATA GAT GCC AAG CCT CTT GAT Leu Ser Val Val Lys Ser Pro Ile Ile Asp Ala Lys Pro Leu Asp 70 75 80		521
AAG AGG TAC TTC GGC AGG CCC CGT AAG GCG GTG AAG ATT ACC ACT Lys Arg Tyr Phe Gly Arg Pro Arg Lys Ala Val Lys Ile Thr Thr 85 90 95		566
ATG ATA CCC GAG TCT GTT AGA CAC TAC CGC GAG GCG GTG AAG AAG Met Ile Pro Glu Ser Val Arg His Tyr Arg Glu Ala Val Lys Lys 100 105 110		611
ATA GAG GGT GTG GAG GAC TCC CTC GAG GCA GAT ATA AGG TTT GCA Ile Glu Gly Val Glu Asp Ser Leu Glu Ala Asp Ile Arg Phe Ala 115 120 125		656
ATG AGA TAT CTG ATA GAT AAG AGG CTC TAC CCG TTC ACG GTT TAC Met Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Arg Leu Tyr Pro Phe Thr Val Tyr 130 135 140		701
CGG ATC CCC GTA GAG GAT GCG GGC CGC AAT CCA GGC TTC CGT GTT Arg Ile Pro Val Glu Asp Ala Gly Arg Asn Pro Gly Phe Arg Val 145 150 155		746
GAC CGT GTC TAC AAG GTT GCT GGC GAC CCG GAG CCC CTA GCG GAT Asp Arg Val Tyr Lys Val Ala Gly Asp Pro Glu Pro Leu Ala Asp 160 165 170		791
ATA ACG CGG ATC GAC CTT CCC CCG ATG AGG CTG GTA GCT TTT GAT Ile Thr Arg Ile Asp Leu Pro Pro Met Arg Leu Val Ala Phe Asp 175 180 185		836
ATA GAG GTG TAT AGC AGG AGG GGG AGC CCT AAC CCT GCA AGG GAT Ile Glu Val Tyr Ser Arg Arg Gly Ser Pro Asn Pro Ala Arg Asp 190 195 200		881
CCA CTG ATA ATA GTG TCG AGG GAC AGC GAG GGC AAG GAG AGG Pro Val Ile Ile Val Ser Leu Arg Asp Ser Glu Gly Lys Glu Arg 205 210 215		926
CTC ATA GAA GCT GAA GGC CAT GAC GAC AGG AGG GTT CTG AGG GAG Leu Ile Glu Ala Glu Gly His Asp Asp Arg Arg Val Leu Arg Glu 220 225 230		971
TTC GTA GAG TAC GTG AGA GCC TTC GAC CCC GAC ATA ATA GTG GGC Phe Val Glu Tyr Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp Ile Ile Val Gly 235 240 245		1016
TAT AAC AGT AAC CAC TTC GAC TGG CCC TAC CTA ATG GAG CGC GCC Tyr Asn Ser Asn His Phe Asp Trp Pro Tyr Leu Met Glu Arg Ala		1061

(20)

特開平7-327684

37

38

250	255	260	
CGT AGG CTC GGG ATT AAG CTC GAC GTT ACA CGC CGT GTG GGG GCA			1106
Arg Arg Leu Gly Ile Lys Leu Asp Val Thr Arg Arg Val Gly Ala			
265	270	275	
GAG CCC ACC ACC AGC GTC TAC GGC CAC GTC TCG GTG CAG GGT AGG			1151
Glu Pro Thr Thr Ser Val Tyr Gly His Val Ser Val Gln Gly Arg			
280	285	290	
CTG AAC GTG GAC CTC TAC GAC TAT GCC GAG GAG ATG CCG GAG ATA			1196
Leu Asn Val Asp Leu Tyr Asp Tyr Ala Glu Glu Met Pro Glu Ile			
295	300	305	
AAG ATG AAG ACG CTT GAG GAG GTA GCG GAG TAC CTA GGC GTT ATG			1241
Lys Met Lys Thr Leu Glu Glu Val Ala Glu Tyr Leu Gly Val Met			
310	315	320	
AAG AAG ACC GAG CGT GTG ATA ATA GAG TGG TGG AGG ATA CCC GAG			1286
Lys Lys Ser Glu Arg Val Ile Ile Glu Trp Trp Arg Ile Pro Glu			
325	330	335	
TAC TGG GAT GAC GAG AAG AAG AGG CAG CTG CTA GAG CGC TAC GCG			1331
Tyr Trp Asp Asp Glu Lys Lys Arg Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Ala			
340	345	350	
CTC GAC GAT GTG AGG GCT ACC TAC GGC CTC GCG GAA AAG ATG CTA			1376
Leu Asp Asp Val Arg Ala Thr Tyr Gly Leu Ala Glu Lys Met Leu			
355	360	365	
CCG TTC GCC ATA CAG CTC TCC ACT GTT ACG GGT GTG CCT CTC GAC			1421
Pro Phe Ala Ile Gln Leu Ser Thr Val Thr Gly Val Pro Leu Asp			
370	375	380	
CAG GTA GGT GCT ATG GGC GTA GGC TTC CGC CTA GAG TGG TAT CTC			1466
Gln Val Gly Ala Met Gly Val Gly Phe Arg Leu Glu Trp Tyr Leu			
385	390	395	
ATG CGT GCA GCC TAC GAT ATG AAC GAG CTG GTG CCG AAC CGG GTG			1511
Met Arg Ala Ala Tyr Asp Met Asn Glu Leu Val Pro Asn Arg Val			
400	405	410	
GAG AGG AGG GGG GAG AGC TAC AAG GGT GCA GTA GTG TTA AAG CCT			1556
Glu Arg Arg Gly Glu Ser Tyr Lys Gly Ala Val Val Leu Lys Pro			
415	420	425	
CTC AAG GGA GTC CAT GAG AAT GTT GTG GTG CTC GAT TTC AGT TCC			1601
Leu Lys Gly Val His Glu Asn Val Val Val Leu Asp Phe Ser Ser			
430	435	440	
ATG TAC CGG AGC ATA ATG ATA AAG TAC AAC GTG GGC CCC GAC ACT			1646
Met Tyr Pro Ser Ile Met Ile Lys Tyr Asn Val Gly Pro Asp Thr			
445	450	455	
ATA GTC GAC GAC CCC TCG GAG TGC CCA AAG TAC GGC GGC TGC TAT			1691
Ile Val Asp Asp Pro Ser Glu Cys Pro Lys Tyr Gly Gly Cys Tyr			
460	465	470	
GTA GCC CCC GAG GTC GGG CAC CGG TTC CGT CGC TCC CCG CCA GGC			1736
Val Ala Pro Glu Val Gly His Arg Phe Arg Arg Ser Pro Pro Gly			
475	480	485	
TTC TTC AAG ACC GTG CTC GAG AAC CTA CTG AAG CTA CGC CGA CAG			1781
Phe Phe Lys Thr Val Leu Glu Asn Leu Leu Lys Leu Arg Arg Gln			
490	495	500	
GTA AAG GAG AAG ATG AAG GAG TTT CCG CCT GAC AGC CCC GAG TAC			1826

(21)

39

Val Lys Glu Lys Met Lys Glu Phe Pro Pro Asp Ser Pro Glu Tyr
 505 510 515
 AGG CTC TAC GAT GAG CGC CAG AAG GCG CTC AAG GTT CTT GCG AAC
 Arg Leu Tyr Asp Glu Arg Gin Lys Ala Leu Lys Val Leu Ala Asn
 520 525 530
 GCG AGC TAT GCC TAC ATG GGG TGG AGC CAT GCC CGC TGG TAC TGC
 Ala Ser Tyr Gly Tyr Met Gly Trp Ser His Ala Arg Trp Tyr Cys
 535 540 545
 AAA CGC TGC GCC GAG GCT GTC ACA GCC TGG GCC CGT AAC CTT ATA
 Lys Arg Cys Ala Glu Ala Val Thr Ala Trp Gly Arg Asn Leu Ile
 550 555 560
 CTG ACA GCT ATC GAG TAT GCC AGG AAG CTC CGC CTA AAG GTT ATA
 Leu Thr Ala Ile Glu Tyr Ala Arg Lys Leu Gly Leu Lys Val Ile
 565 570 575
 TAT GGA GAC ACC GAC TCC CTC TTC GTG GTC TAT GAC AAG GAG AAG
 Tyr Gly Asp Thr Asp Ser Leu Phe Val Val Tyr Asp Lys Glu Lys
 580 585 590
 GTT GAG AAG CTG ATA GAG TTT GTC GAC AAG GAG CTG CGC TTT GAG
 Val Glu Lys Leu Ile Glu Phe Val Glu Lys Glu Leu Gly Phe Glu
 595 600 605
 ATA AAG ATA GAC AAG ATC TAC AAG AAA GTG TTC TTC ACG GAG GCT
 Ile Lys Ile Asp Lys Ile Tyr Lys Lys Val Phe Phe Thr Glu Ala
 610 615 620
 AAG AAG CGC TAT GTA GGT CTC CTC GAG GAC GGA CGT ATA GAC ATC
 Lys Lys Arg Tyr Val Gly Leu Leu Glu Asp Gly Arg Ile Asp Ile
 625 630 635
 GTG GCC TTT GAA GCA GTC CGC CGC GAC TGG TGC GAG CTG GCT AAG
 Val Gly Phe Glu Ala Val Arg Gly Asp Trp Cys Glu Leu Ala Lys
 640 645 650
 GAG GTG CAG GAG AAG GCG GCT GAG ATA GTG TTG AAT ACG GGG AAC
 Glu Val Gin Glu Lys Ala Ala Glu Ile Val Leu Asn Thr Gly Asn
 655 660 665
 GTG GAC AAG GCT ATA AGC TAC ATA AGG GAG GTA ATA AAG CAG CTC
 Val Asp Lys Ala Ile Ser Tyr Ile Arg Glu Val Ile Lys Gin Leu
 670 675 680
 CGC GAG GGC AAG GTG CCA ATA ACA AAG CTT ATC ATA TGG AAG ACG
 Arg Glu Gly Lys Val Pro Ile Thr Lys Leu Ile Ile Trp Lys Thr
 685 690 695
 CTG AGC AAG AGG ATA GAG GAG TAC GAG CAT GAC GCG CCT CAT GTG
 Leu Ser Lys Arg Ile Glu Glu Tyr Glu His Asp Ala Pro His Val
 700 705 710
 ATG GCT GCA CGG CCT ATG AAG GAG GCA GCC TAC GAG GTG TCT CCC
 Met Ala Ala Arg Arg Met Lys Glu Ala Gly Tyr Glu Val Ser Pro
 715 720 725
 GGC GAT AAG GTG GGC TAC GTC ATA GTT AAG GGT AGC GGG AGT GTG
 Gly Asp Lys Val Gly Tyr Val Ile Val Lys Gly Ser Gly Ser Val
 730 735 740
 TCC AGC AGG GCC TAC CCC TAC TTC ATG GTT GAT CCA TCG ACC ATC
 Ser Ser Arg Ala Tyr Pro Tyr Phe Met Val Asp Pro Ser Thr Ile
 745 750 755

特開平7-327684

40

41

GAC GTC AAC TAC TAT ATT GAC CAC CAG ATA GTG CCG GCT GCT CTG
Asp Val Asn Tyr Tyr Ile Asp His Gln Ile Val Pro Ala Ala Leu
760 765 770
AGG ATA CTC TCC TAC TTC GGA GTC ACC GAG AAA CAG CTC AAG GCG
Arg Ile Leu Ser Tyr Phe Gly Val Thr Glu Lys Gln Leu Lys Ala
775 780 785
GCG GCT AGC GTG CAG AGA AGC CTC TTC GAC TTC TTC GCC TCA AAG
Ala Ala Thr Val Gln Arg Ser Leu Phe Asp Phe Phe Ala Ser Lys
790 795 800
AAA TAGCTCTCC ACCCGCTAG CTTTATTAAA CGCGTAGGCA CAAGCTCTCC 2734
Lys
GAGAGGCCCTG GAGGGTAAGG GGTGCAATAG AGCCAGCCTC TCCGCCGAGG CCGTGCGCTC 2794
TTGGGTGGCT TTGGAATGATC CTCGCATCCT CGAGATCCTT GGCGTGGATA GTAAGGCCGTG 2854
TCGACGTAGT ACTCGAGGT GTCGATGCGC CGCACCCGGT CTCGACAAGG AGCCCTGCCGC 2914
TAGAGAGGAT GGTGCAAGAGC CTAGGAAGC GCCTCTTAAT AGTCATCAAT AAGGCTGACC 2974
TGGTGCCCCG CGGGGTGCT GAGAAGTGGG AGCGCATCCT CGAGGATCAG GGTACCGTA 3034
CTGCTACAT GGCTGCCGC GATCACAAAGG GTAC 3068

【0047】配列番号：9

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTACATATTG TCGTTAGAAC GCG 23

【0048】配列番号：10

配列の長さ：23

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TAATACGACT CACTATAGGG AGA 23

【0049】配列番号：11

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGGGTCGTCG ACTATAGT 18

【0050】配列番号：12

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATACTGACAG CTATCCAG 18

【0051】配列番号：13

42

2591

2636

2681

2734

3068

配列の長さ：18

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GTATACGGGG TTTACGGT 18

【0052】配列番号：14

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ATCAAGCAGA CGCTGCAG 18

【0053】配列番号：15

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

40 ATCTCACTGG CGCCATGGAG GCTCAGCCGC 30

【0054】配列番号：16

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGCATGGAGC ACCATGGTGC CTCAG 25

【図面の簡単な説明】

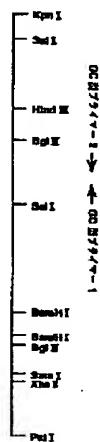
50 【図1】pPO500-IIに挿入されている約3.1k

43

bのDNA断片の制限酵素地図、及びPCRに用いたプライマーの位置を示す図である。

【図2】pPO100-1に挿入されている約4.2k

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁵
C 12-R 1:01)
(C 12 N 9/12
C 12 R 1:19)

識別記号 庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 R 1:01)

THIS PAGE BLANK (USPTO)